

Translation of pertinent portions of DE-10019862 into English

Column 3, paragraph [0020]:

The perfusion cover generally denoted at 1 on the Figures consists essentially of a chamber (3) of a suitable plastics where there are channels (8) and (9) that form a connection between the respective liquid inlets (6) and the liquid supply connection (10). The openings located above the cavities (4) of the multiwell plate (2) for liquid feed are provided with short thick tubes (6'). In the cover bottom (5), for the cavities, are arranged openings for the liquid outlet (7), which are in turn provided with long thin tubes (7'), which serve to draw off medium from the cavity (4) and whose length determine the height of the medium column in the cavity (4). The tubes (7') extend almost to the cavity bottom (13). The chamber (3) of the perfusion cover (1) is provided with an opening for the liquid outlet (11) that uses an adaptor for connecting a hose.



⑬ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 19 862 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:  
**C 12 M 1/18**  
C 12 M 1/24  
C 12 M 3/04  
C 12 N 5/02

⑳ Aktenzeichen: 100 19 862.7  
㉔ Anmeldetag: 18. 4. 2000  
㉕ Offenlegungstag: 8. 11. 2001

**DE 100 19 862 A 1**

⑦① Anmelder:  
Cell-Lining Gesellschaft für Zellkultivierung mbH,  
12489 Berlin, DE  
  
⑦② Vertreter:  
Wehlan, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
10315 Berlin

⑦③ Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren und Vorrichtung zur Automatisierung des Medienwechsels in Zellkulturen

⑤⑦ Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Automatisierung des Medienwechsels in Zellkulturen und zur Minimierung der Kontaminationsgefahr in Gestalt eines durchsichtigen Perfusionsdeckels für mikroskopierfähige Multiwellplatten. Der Perfusionsdeckel verfügt über einen zentralen Zu- sowie Abgang für das Kulturmedium. Über diese kann ein kontinuierlicher bzw. diskontinuierlicher Kulturmedienaustausch in jedem der einzelnen Wells bewerkstelligt werden.

**DE 100 19 862 A 1**

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und auf eine Vorrichtung zur Automatisierung des Medienwechsels in Zellkulturen und zur Minimierung der Kontaminationsgefahr in Gestalt eines durchsichtigen Perfusionsdeckels für mikroskopierfähige Multiwellplatten. Der Perfusionsdeckel verfügt über einen zentralen Zu- sowie Abgang für das Kulturmedium. Über ihn kann ein kontinuierlicher bzw. diskontinuierlicher Kulturmedienaustausch in jedem der einzelnen Wells bewerkstelligt werden. Hierfür wird der Perfusionsdeckel über den zentralen Zulauf mittels Schlauch an eine externe Pumpe angeschlossen.

[0002] Multiwellplatten sind seit vielen Jahren für die Kultivierung von Zellen und Geweben in der Zellkulturtechnik bekannt. Zum Schutz der Zellkulturen vor Kontaminationen durch Fremdkeime werden die Multiwellplatten mit einem passenden Deckel verschlossen. Abhängig von den in den Kavitäten wachsenden Zellen oder Geweben ist ein regelmäßiger Medienaustausch zum Erhalt der Vitalität der Kulturen notwendig (Paul J.: Cell and Tissue Culture. 5th Ed. Livingston, Edinburgh, 1975).

[0003] Der manuelle Medienwechsel ist zeitaufwendig und birgt die permanente Gefahr einer Kontamination mit Fremdkeimen in sich (Freshney R. I.: Animal Cell Culture: A Practical Approach. 2nd Ed. A. R. Liss, New York, 1987).

[0004] Aufgabe der Erfindung ist es, den Medienwechsel in Zellkulturen zu automatisieren und gleichzeitig die Kontaminationsgefahr zu minimieren.

[0005] Zur Lösung dieser Aufgabe wurden ein Verfahren und eine Vorrichtung in Gestalt eines durchsichtigen Perfusionsdeckels entwickelt, deren Aufgabe darin besteht, die über eine externe Pumpe zugeleiteten, definierten Volumina an frischem Medium in die Kavitäten einzufüllen und verbrauchtes Medium abzusaugen. Die Konstruktion der Erfindung gewährleistet identische Medienvolumenzugaben in jede der Kavitäten und verhindert aufgrund der Absaugleistung ein Überlaufen der Kavitäten.

[0006] Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass bei Parallelschaltung identischer Kanäle zu den einzelnen Kavitäten ein zentraler Kanal zur Medienzufuhr zum Perfusionsdeckel ausreichend ist und somit auf eine aufwendige Regelungstechnik bei separater Versorgung der einzelnen Kavitäten verzichtet werden kann.

[0007] Erfindungsgemäß wird passend zu einer mikroskopierfähigen Multiwellplatte ein Perfusionsdeckel für den automatisierten Kulturmedienaustausch mittels einer externen Pumpe bereitgestellt. Der rechteckige Deckel besitzt einen doppelten Boden, wodurch eine Hohlkammer ausgebildet wird. Im unteren, zur Kavität weisenden Boden sind jeweils zwei Öffnungen pro Kavität der Multiwellplatte angebracht, wobei eine Öffnung für den Medienzufluss und eine für den Medienabfluss vorgesehen ist. Die Öffnung für den Medienzufluss ist mit einem kurzen, dicken Rohr, die für den Medienabfluss mit einem dünnen, längeren Rohr versehen, welche jeweils senkrecht in die Kavität hineinweisen. Die Rohre für den Medienzufluss führen über gleich lange, geschlossene Kanäle zu einem zentralen Kanal, welcher in eine Öffnung mit einem Adapter (z. B. Luer) für einen externen Schlauch an der schmalen Seite der Hohlkammer mündet. Eine weitere Öffnung mit einem Adapter (z. B. Luer) zum Anschluss eines externen Schlauchs ist direkt mit der Hohlkammer verbunden.

[0008] Die Funktionsweise des Perfusionsdeckels ist dadurch gekennzeichnet, dass eine externe Pumpe verbrauchtes Kulturmedium aus den Kavitäten über die dünnen und längeren Rohre in die Hohlkammer und von dort durch die direkte Öffnung in den externen Schlauch absaugt, der ent-

weder in einen Abfallbehälter oder, bei geschlossenem Kreislauf, in das Vorratsgefäß für das Kulturmedium mündet. Die Zuflussraten in die Kavitäten der Multiwellplatte durch die jeweiligen Medienzuflussöffnungen sind identisch und werden durch den Medienzufluss in die Kanäle bestimmt. Beim Anhalten des Medienzuflusses in die Kanäle stoppt der Mediumaustritt aus den sechs Öffnungen für den Medienzufluss. Um ein Überlaufen des Kulturmediums in den Kavitäten zu verhindern, wird das Medienvolumen in den Kavitäten durch Absaugen von überschüssigem Kulturmedium über die direkt am Hohlkammerboden befestigten Absaugrohre konstant gehalten. Das Absaugen wird über eine externe Pumpe bewerkstelligt. Dabei ist die Absaugleistung höher als die Zuflussleistung einzustellen. Durch die vorteilhafte Gestaltung der Absaugrohre ist ein zuverlässiges Absaugen aus allen Kavitäten sichergestellt. Das Stoppen der Absaugpumpe führt nicht zu einem Mediumrückfluss über die Mediumabflusskanäle in die Kavitäten. Das maximale Füllvolumen der Kavitäten ist durch die Länge der Absaugkanülen gegeben.

[0009] Das erfindungsgemäße Gerät besteht aus einer Kombination bekannter Elemente (mikroskopierfähige Multiwellplatte mit einem passenden Deckel, Kavitäten) und neuen Ausgestaltungen (durchsichtiger Perfusionsdeckel mit doppeltem Boden sowie Zu- und Ableitungssystem für den automatisierten Kulturmedienaustausch), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil (synergistischen Effekt) und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass es nunmehr gelingt, den Medienwechsel zu automatisieren und gleichzeitig die Kontaminationsgefahr zu minimieren. Die Erfindung betrifft mithin ein Verfahren zur Automatisierung des Medienwechsels in Zellkulturen und zur Minimierung der Kontaminationsgefahr sowie eine Vorrichtung dafür in Gestalt eines durchsichtigen Perfusionsdeckels (1) für mikroskopierfähige Multiwellplatten, der aufgrund eines doppelten Bodens eine Hohlkammer ausbildet.

[0010] Der erfindungsgemäße Perfusionsdeckel (1), passend für eine mikroskopierfähige Multiwellplatte (2), weist am Deckelboden (5), der jeweiligen Kavität (4) direkt gegenüber liegend (Fig. 2), je eine Öffnung für Flüssigkeitszufluss (6) und eine Öffnung zum Flüssigkeitsabfluss (7) auf. Die Öffnung für den Flüssigkeitszufluss (6) wird durch ein senkrecht dickes kurzes Rohr (6'), die Öffnung für den Flüssigkeitsabfluss (7) durch ein senkrecht dünnes langes Rohr (7') verlängert, wobei die Rohre für den Flüssigkeitszufluss (6') über kleine geschlossene, gleich lange Kanäle gleichen Durchmessers (8) im Inneren der Hohlkammer (3) zusammengeführt werden und dann in einen dicken Kanal (9) münden, an dessen äußerer Öffnung (10) der Schlauch für den zentralen Kulturmedienzufluss angeschlossen wird. Dabei weist die Stirnseite der Hohlkammer (3) zusätzlich eine Öffnung mit einem Adapter (z. B. Luer) für einen externen Schlauch für den Kulturmedienabfluss (11) aus der Hohlkammer (3) auf, über den die Flüssigkeit, die durch die Flüssigkeitsabsaugrohre (7') in die Hohlkammer (1) gelangt, diese dort verlässt.

[0011] Der Perfusionsdeckel ist dadurch gekennzeichnet, dass in den Zuflusskanälen (8) das Zuflussrohr (6') integriert ist und die Kanäle (8) aus einem Stück gefertigt sind, ohne dabei (Steck-)Verbindungsstellen aufzuweisen. Die Passform des Perfusionsdeckels (Fig. 3) ist mit allen handelsüblichen Multiwellplatten identisch.

[0012] Die Absaugrohre (7') des Perfusionsdeckels (Fig. 3) besitzen einen geringeren Innendurchmesser als die Zuflussrohre (6'). Sie, die Absaugrohre (7'), weisen senkrecht im Abstand von ca. 1-10 mm (Fig. 1) vom Kavitätenrand in die Kavitäten (4) der Multiwellplatte (Fig. 2). Die Zufluss-

rohre (6'), die ca. 2-17 mm vom Kavitätenrand entfernt liegen, weisen senkrecht in die Kavitäten (4) der Bodenplatte (Fig. 2) und besitzen den größtmöglichen Abstand zu den Absaugrohren (Fig. 1 (12)). Das Absaugrohr (7) ist länger als das Zuflussrohr (6') und stellt eine ausreichende Benetzung des Kavitätenbodens (13) sicher. Das Zuflussrohr (6') ist so kurz gestaltet, dass an ihm gebildete Tropfen abreißen, ohne zuvor die Flüssigkeit in den Kavitäten (4) berührt zu haben.

[0013] Handelsübliche dreidimensionale Kulturträger (14) können in die Kavitäten (4) der Bodenplatte (Fig. 2) eingesetzt werden, wobei die Flüssigkeitszufuhr über das Zuflussrohr (6') des Perfusionsdeckels ins Innere des dreidimensionalen Kulturträgers (14) erfolgt und der Flüssigkeitsabfluss über das Abflussrohr (7') des Perfusionsdeckels erfolgt, das zwischen der Außenwand des dreidimensionalen Kulturträgers (14) und der Kavitätenwandung (15) zu positionieren ist.

[0014] Die seitlichen Öffnungen (10, 11) an einer beliebigen Seite des Perfusionsdeckels (Fig. 4) sind für die Flüssigkeitszu- (10) und -abführung (11) als Schlauch-Adapter gestaltet, welche an der Außenwandung des Perfusionsdeckels abschließen.

#### Ausführungsbeispiel

[0015] Die Erfindung wird im folgenden anhand der Figuren (Figur) an dem Ausführungsbeispiel einer 6-Wellplatte näher erläutert, ohne auf dieses Beispiel beschränkt zu sein. Es zeigen:

[0016] Fig. 1 eine seitliche Röntgendarstellung durch die mit dem Perfusionsdeckel versehene Multiwellplatte;

[0017] Fig. 2 eine Draufsicht der Multiwellplatte;

[0018] Fig. 3 eine Röntgendarstellung der Draufsicht des Perfusionsdeckels;

[0019] Fig. 4 eine Seitenansicht der mit dem Perfusionsdeckel versehenen Multiwellplatte.

[0020] Der in den Figuren allgemein mit 1 bezeichnete Perfusionsdeckel besteht im wesentlichen aus einer Hohlkammer (3) aus einem geeigneten Kunststoff, in der sich die Kanäle (8) und (9) befinden, die die Verbindung zwischen den jeweiligen Flüssigkeitszuflüssen (6) und dem Anschluss für den Flüssigkeitszufluss (10) bilden. Die über den Kavitäten (4) der Multiwellplatte (2) befindlichen Öffnungen für die Flüssigkeitszufuhr sind mit kurzen dicken Rohren (6') 45 versehen. Pro Kavität sind in den Deckelboden (5) Öffnungen für den Flüssigkeitsabfluss (7) eingebracht, die, wiederum mit langen dünnen Rohren (7') versehen, zum Absaugen des Mediums aus der Kavität (4) dienen und deren Länge die Höhe der Mediensäule in der Kavität (4) bestimmen. Die Rohre (7') reichen fast bis auf den Kavitätenboden (13). Der Hohlraum (3) des Perfusionsdeckels (1) ist mit einer Öffnung für den Flüssigkeitsabfluss (11) versehen, die über einen entsprechenden Adapter zum Anschluss eines Schlauchs verfügt.

[0021] Der Abstand (12) zwischen den Öffnungen (6) und (7) ist so zu wählen, dass, einerseits, die Öffnungen (6) und (7) innerhalb der Wandungen (15) der jeweiligen Kavität (4) liegen und, andererseits, die Einbringung eines Kulturträgers (14) dergestalt möglich ist, dass die Öffnung (6) mit dem Rohr (6) in den Kulturträger hinein sowie die Öffnung (7) mit dem Rohr (7') in den Spalt zwischen Kulturträger und Kavitätenwandung ragt.

#### Bezugszeichenliste

- 1 Perfusionsdeckel
- 2 Multiwellplatte

- 3 Hohlkammer
- 4 Kavität
- 5 Deckelboden
- 6 Flüssigkeitszufluss
- 6' Kurzes dickes Rohr
- 7 Flüssigkeitsabfluss
- 7' Langes dünnes Rohr
- 8 Kanäle gleicher Länge und Durchmessers
- 9 Zentraler Kanal
- 10 Öffnung Flüssigkeitszufluss
- 11 Öffnung Flüssigkeitsabfluss
- 12 Maximaler Abstand
- 13 Kavitätenboden
- 14 3D-Kulturträger
- 15 Kavitätenwand

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Automatisierung des Medienwechsels in Zellkulturen und zur Minimierung der Kontaminationsgefahr, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein durchsichtiger Perfusionsdeckel für mikroskopierfähige Multiwellplatten eingesetzt wird, der aufgrund eines doppelten Bodens eine Hohlkammer ausbildet.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass bei Parallelschaltung identischer Kanäle zu einzelnen Kavitäten der Multiwellplatte ein zentraler Kanal für die Medienzufuhr zum Perfusionsdeckel eingesetzt wird.
3. Vorrichtung zur Automatisierung des Medienwechsels in Zellkulturen und zur Minimierung der Kontaminationsgefahr in Gestalt eines durchsichtigen Perfusionsdeckels (1) für mikroskopierfähige Multiwellplatten (2), dadurch gekennzeichnet, dass er aufgrund eines doppelten Bodens eine Hohlkammer (3) ausbildet.
4. Durchsichtiger Perfusionsdeckel (1) nach Anspruch 3, passend für eine mikroskopierfähige Multiwellplatte (2), welcher am Deckelboden (5), der jeweiligen Kavität (4) direkt gegenüber liegend (Fig. 2), je eine Öffnung für Flüssigkeitszufluss (6) und eine Öffnung zum Flüssigkeitsabfluss (7) aufweist, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die Öffnung für den Flüssigkeitszufluss (6) durch ein senkrechtes dickes kurzes Rohr (6'), die Öffnung für den Flüssigkeitsabfluss (7) durch ein senkrechtes dünnes langes Rohr (7') verlängert werden, wobei die Rohre für den Flüssigkeitszufluss (6) über kleine geschlossene, gleich lange Kanäle gleichen Durchmessers (8) im Inneren der Hohlkammer (3) zusammengeführt werden und dann in einen dicken Kanal (9) münden, an dessen äußerer Öffnung (10) der Schlauch für den zentralen Kulturmedienzufluss angeschlossen wird, wobei die Stirnseite der Hohlkammer (3) dadurch gekennzeichnet ist, dass sie zusätzlich eine Öffnung mit einem Adapter für einen externen Schlauch für den Kulturmedienabfluss (11) aus der Hohlkammer (3) aufweist, über den die Flüssigkeit, die durch die Flüssigkeitsabsaugrohre (7') in die Hohlkammer (1) gelangt, diese dort verlässt.
5. Perfusionsdeckel nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass in den Zuflusskanälen (8) das Zuflussrohr (6') integriert ist und die Kanäle (8) aus einem Stück gefertigt sind, ohne dabei (Steck-)Verbindungsstellen aufzuweisen.
6. Perfusionsdeckel nach den Ansprüchen 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Passform des Perfusionsdeckels (Fig. 3) mit allen handelsüblichen Multiwellplatten identisch ist.
7. Perfusionsdeckel nach den Ansprüchen 3 bis 6, da-

durch gekennzeichnet, dass die Absaugrohre (7) des Perfusionsdeckels (Fig. 3) einen geringeren Innendurchmesser im Vergleich zu den Zuflussrohren (6) aufweisen.

8. Perfusionsdeckel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Absaugrohre (7) senkrecht im Abstand von 1 bis 10 mm (Fig. 1) vom Kavitätenrand in die Kavitäten (4) der Multiwellplatte (Fig. 2) weisen.

9. Perfusionsdeckel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Zuflussrohre (6) senkrecht in die Kavitäten (4) der Bodenplatte (Fig. 2) weisen und 2 bis 17 mm vom Kavitätenrand entfernt liegen und den größtmöglichen Abstand zu den Absaugrohren aufweisen (Fig. 1 (12)).

10. Perfusionsdeckel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Absaugrohr (7) länger als das Zuflussrohr (6) ist und eine ausreichende Benetzung des Kavitätenbodens (13) sicherstellt, und dass das Zuflussrohr (6) so kurz ist, dass an ihm gebildete Tropfen abreißen, ohne zuvor die Flüssigkeit in den Kavitäten (4) berührt zu haben.

11. Perfusionsdeckel nach den Ansprüchen 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass handelsübliche dreidimensionale Kulturträger (14) in die Kavitäten (4) der Bodenplatte (Fig. 2) eingesetzt werden können, wobei die Flüssigkeitszufuhr über das Zuflussrohr (6) des Perfusionsdeckels ins Innere des dreidimensionalen Kulturträgers (14) erfolgt und der Flüssigkeitsabfluss über das Abflussrohr (7) des Perfusionsdeckels erfolgt, das zwischen der Außenwand des dreidimensionalen Kulturträgers (14) und der Kavitätenwandung (15) zu positionieren ist.

12. Perfusionsdeckel nach den Ansprüchen 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass die seitlichen Öffnungen (10, 11) vorzugsweise an der Stirnseite des Perfusionsdeckels (Fig. 4) für die Flüssigkeitszu- (10) und -abführung (11) als Schlauch-Adapter gestaltet sind.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

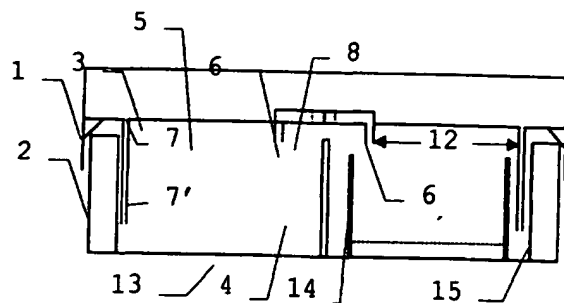


Fig. 1

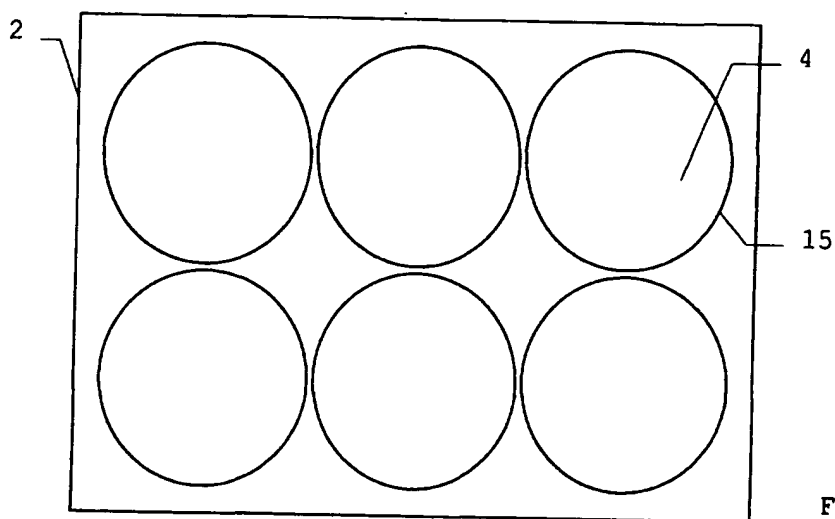


Fig. 2

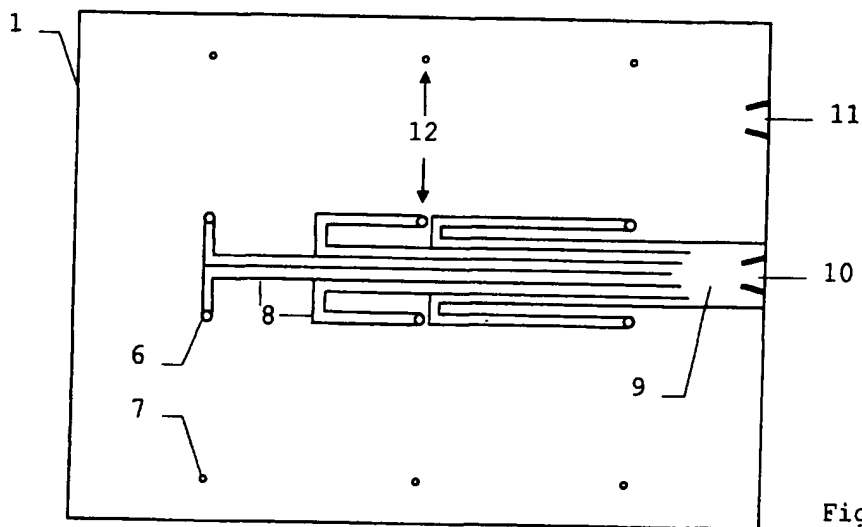


Fig. 3

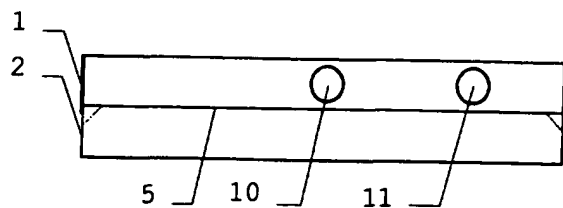


Fig. 4